

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005480

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-093417
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 6 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 9 3 4 1 7

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

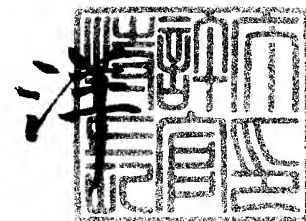
J P 2 0 0 4 - 0 9 3 4 1 7

出 願 人
Applicant(s): 株式会社日本触媒

2 0 0 5 年 4 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0958
【提出日】 平成16年 3月 26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/09
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市共和 1－3－3 3－6 0 4
 【氏名】 森田 英利
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県相模原市矢部 2－1 9－2 マンションリッチ 1 0 5 号室
 【氏名】 堀川 洋
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番地 1 2 株式会社 日本触媒内
 【氏名】 安田 信三
【発明者】
 【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 丁目 2 5 番地 1 2 株式会社 日本触媒内
 【氏名】 向山 正治
【特許出願人】
 【識別番号】 0000004628
 【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒
【代理人】
 【識別番号】 100091096
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 平木 祐輔
【選任した代理人】
 【識別番号】 100096183
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 石井 貞次
【選任した代理人】
 【識別番号】 100118773
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 藤田 節
【選任した代理人】
 【識別番号】 100101904
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 島村 直己
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 015244
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0217688

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、並びに 1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子、を含む形質転換体。

【請求項 2】

グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子が *Lactobacillus reuteri* に由来する、請求項 1 記載の形質転換体。

【請求項 3】

グリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子が以下の (a) 又は (b) のタンパク質：

(a) 配列番号 1 又は 3 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 又は 3 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であり、

グリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニットをコードする遺伝子が以下の (c) 又は (d) のタンパク質：

(c) 配列番号 5 又は 7 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(d) 配列番号 5 又は 7 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であり、

グリセロールデヒドラターゼのスモールサブユニットをコードする遺伝子が以下の (e) 又は (f) のタンパク質：

(e) 配列番号 9 又は 11 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(f) 配列番号 9 又は 11 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びミディウムサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である、請求項 2 記載の形質転換体。

【請求項 4】

グリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子が、以下の (a) 又は (b) の DNA：

(a) 配列番号 2 又は 4 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 又は 4 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA を含み、

グリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニットをコードする遺伝子が、以下の (c) 又は (d) の DNA：

(c) 配列番号 6 又は 8 で表される塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 6 又は 8 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的

な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含み、

グリセロールデヒドラターゼのスモールサブユニットをコードする遺伝子が、以下の(e)又は(f)のDNA:

(e) 配列番号10又は12で表される塩基配列からなるDNA

(f) 配列番号10又は12で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びミディアムサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む、請求項2記載の形質転換体。

【請求項5】

プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、該遺伝子が*Lactobacillus reuteri*に由来する、請求項1～4のいずれか1項記載の形質転換体。

【請求項6】

プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である請求項5記載の形質転換体:

(a) 配列番号13又は15で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号13又は15で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項7】

プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、請求項5記載の形質転換体:

(a) 配列番号14又は16で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号14又は16で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項8】

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、該遺伝子が*Lactobacillus reuteri*に由来する、請求項1～7のいずれか1項記載の形質転換体。

【請求項9】

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である請求項8記載の形質転換体:

(a) 配列番号17で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号17で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項10】

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、請求項8記載の形質転換体:

(a) 配列番号18で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号18で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項11】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子が*Lactobacillus reuteri*に由来する、請求項1～10のいずれか1項記載の形質転換体。

【請求項 1 2】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子が以下の (a) 又は (b) のタンパク質：

(a) 配列番号 1 9 又は 2 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 9 又は 2 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であり、

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットをコードする遺伝子が以下の (c) 又は (d) のタンパク質：

(c) 配列番号 2 3 又は 2 5 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(d) 配列番号 2 3 又は 2 5 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする遺伝子である、請求項 1 1 記載の形質転換体。

【請求項 1 3】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子が、以下の (a) 又は (b) の DNA：

(a) 配列番号 2 0 又は 2 2 で表される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 2 0 又は 2 2 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする DNA を含み、

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットをコードする遺伝子が、以下の (c) 又は (d) の DNA：

(c) 配列番号 2 4 又は 2 6 で表される塩基配列からなる DNA

(d) 配列番号 2 4 又は 2 6 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする DNA を含む、請求項 1 1 記載の形質転換体。

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項記載の形質転換体をグリセロールの存在下で培養することにより、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子、を含む形質転換体を用いてグリセロールから1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

1, 3-プロパンジオールはポリエステル繊維の生産並びにポリウレタン及び環状化合物の製造に使用されるモノマーである。1, 3-プロパンジオール合成経路としては、種々ものが知られている。例えば、ホスフィン、水、一酸化炭素、水素及び酸の存在下、触媒上でのエチレンオキシドの変換により製造する方法；アクロレインの触媒的液相水和、続いての還元により製造する方法；一酸化炭素及び水素存在下、周期律表のV I I I族の原子を持っている触媒上で炭化水素（例えば、グリセロール）を反応させることにより製造する方法などが報告されている。しかしながら、伝統的化学合成法は、費用がかかるとともに、環境汚染物質を含んでいる一連の廃棄物を発生するという問題を有していた。

【0003】

これに対し、1, 3-プロパンジオールを製造するための生物学的方法として、グリセロールから1, 3-プロパンジオールへの発酵を触媒する酵素を有する微生物を利用する方法が報告されている（特許文献1～6参照）。グリセロールから1, 3-プロパンジオールを生産できる細菌株が、例えば、Citrobacter属、Clostridium属、Enterobacter属、Salmonella属、Klebsiella属、Lactobacillus属、Caloramator属及びListeria属に属する細菌の群で発見されている。

【0004】

生物学系において、グリセロールは2段階の酵素触媒反応を経て、1, 3-プロパンジオールに変換される。第1段階において、グリセロールデヒドラターゼがグリセロールを3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド（3-HPA）及び水へ変換する（グリセロール→3-HPA+H₂O）。第2段階において、3-HPAがNAD⁺結合オキシドレダクターゼにより1, 3-プロパンジオールに還元される（3-HPA+NADH+H⁺→1, 3-プロパンジオール+NAD⁺）。1, 3-プロパンジオールはそれ以上代謝されず、結果として媒体中に堆積する。

【0005】

しかし、生物学系におけるグリセロールからの1, 3-プロパンジオールの生産は、一般に嫌気性条件下でグリセロールを単独の炭素源とし、他の外因性還元当量受容物質の不在下で行われるため、最初に、NAD⁺（又はNADP⁺）結合グリセロールデヒドロゲナーゼによるグリセロールのジヒドロキシアセトン（DHA）への酸化（グリセロール+NAD⁺→DHA+NADH+H⁺）というグリセロールに関する平行経路が働く。そして、DHAは、DHAキナーゼによってジヒドロキシアセトンリン酸へリン酸化され、生合成及びATP生成のために利用される。

【0006】

従って、従来の微生物を用いた1, 3-プロパンジオールの製造方法においては、原料であるグリセロールの半分が上記平行経路において消費され、原料グリセロールに対する

生成物の収率が低く、効率性及びコストの点で問題があった。

【0007】

一方、3-ヒドロキシプロピオン酸及びそのエステルは、脂肪族ポリエステル原料として有用な化合物であり、また、これらから合成されるポリエステルは生分解性の環境にやさしいポリエステルとして注目されている。

【0008】

3-ヒドロキシプロピオン酸は、通常、アクリル酸に対する水の付加により、又はエチレンクロロヒドリンとシアン化ナトリウムとの反応により製造される。アクリル酸を水和する反応は平衡反応であるため、反応率が制限されるという問題があった。エチレンクロロヒドリンの反応の場合は、毒性の強い物質の使用が必要であり、さらに加水分解工程を追加しなくてはならない。この場合、塩化ナトリウム及びアンモニウム塩が大量に生じるという問題がある。

【0009】

【特許文献1】WO98/21339

【特許文献2】WO98/21341

【特許文献3】米国特許第5,821,092号

【特許文献4】米国特許第5,254,467号

【特許文献5】米国特許第5,633,362号

【特許文献6】米国特許第5,686,276号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、グリセロールから1,3-プロパンジオールを製造する際の効率性を改善し、工業上有用なプロセスを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、並びに1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子、を含む形質転換体を、グリセロールの存在下で培養することにより、2種類の有用な化合物を効率的に製造できることを見だし、本発明を完成させるに至った。

【0012】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、並びに1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子、を含む形質転換体。

【0013】

(2) グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子が *Lactobacillus reuteri* に由来する、(1) 記載の形質転換体。

【0014】

(3) グリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質：

(a) 配列番号1又は3で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号1又は3で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠

失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質

をコードする遺伝子であり、

グリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニットをコードする遺伝子が以下の(c)又は(d)のタンパク質：

(c) 配列番号5又は7で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(d) 配列番号5又は7で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質

をコードする遺伝子であり、

グリセロールデヒドラターゼのスモールサブユニットをコードする遺伝子が以下の(e)又は(f)のタンパク質：

(e) 配列番号9又は11で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(f) 配列番号9又は11で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びミディウムサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質

をコードする遺伝子である、(2)記載の形質転換体。

【0015】

(4) グリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNA：

(a) 配列番号2又は4で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号2又は4で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含み、

グリセロールデヒドラターゼのミディウムサブユニットをコードする遺伝子が、以下の(c)又は(d)のDNA：

(c) 配列番号6又は8で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号6又は8で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含み、

グリセロールデヒドラターゼのスモールサブユニットをコードする遺伝子が、以下の(e)又は(f)のDNA：

(e) 配列番号10又は12で表される塩基配列からなるDNA

(f) 配列番号10又は12で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニット及びミディウムサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む、(2)記載の形質転換体。

【0016】

(5) プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、該遺伝子が*Lactobacillus reuteri*に由来する、(1)～(4)のいずれかに記載の形質転換体。

【0017】

(6) プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)の

タンパク質をコードする遺伝子である（５）記載の形質転換体：

- (a) 配列番号 13 又は 15 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
- (b) 配列番号 13 又は 15 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【0018】

（７）プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、（５）記載の形質転換体：

- (a) 配列番号 14 又は 16 で表される塩基配列からなるDNA
- (b) 配列番号 14 又は 16 で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつプロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0019】

（８）1, 3-プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、該遺伝子が*Lactobacillus reuteri*に由来する、（１）～（７）のいずれかに記載の形質転換体。

【0020】

（９）1, 3-プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である（８）記載の形質転換体：

- (a) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
- (b) 配列番号 17 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ 1, 3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質。

【0021】

（１０）1, 3-プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、（８）記載の形質転換体：

- (a) 配列番号 18 で表される塩基配列からなるDNA
- (b) 配列番号 18 で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ 1, 3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0022】

（１１）グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子が*Lactobacillus reuteri*に由来する、（１）～（１０）のいずれかに記載の形質転換体。

【0023】

（１２）グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質：

- (a) 配列番号 19 又は 21 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
- (b) 配列番号 19 又は 21 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であり、

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスモールサブユニットをコードする遺伝子が以下の(c)又は(d)のタンパク質：

- (c) 配列番号 23 又は 25 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質
- (d) 配列番号 23 又は 25 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質

をコードする遺伝子である、(11)記載の形質転換体。

【0024】

(13) グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNA:

(a) 配列番号20又は22で表される塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号20又は22で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のsmallサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む、

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のsmallサブユニットをコードする遺伝子が、以下の(c)又は(d)のDNA:

(c) 配列番号24又は26で表される塩基配列からなるDNA

(d) 配列番号24又は26で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む、(11)記載の形質転換体。

【0025】

(14) (1)～(13)のいずれかに記載の形質転換体をグリセロールの存在下で培養することにより、1,3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【発明の効果】

【0026】

本発明により、グリセロールから1,3-プロパンジオールを製造する際の原料グリセロールのロスを低減し、かつ1,3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

本発明の形質転換体は、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディウムサブユニットをコードする遺伝子及びsmallサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びsmallサブユニットをコードする遺伝子、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、並びに1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含む。

【0028】

本発明の形質転換体は、グリセロールを脱水して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド及び水へ変換する反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質としては、グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼが挙げられる。グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼは、ラージサブユニット、ミディウムサブユニット及びsmallサブユニットの3種のサブユニットから構成される。本発明の形質転換体には、グリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ならびにグリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子とジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもののいずれをも包含する。

【0029】

グリセロールデヒドラターゼ又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えば、Lactobacillus属、Citrobacter属、

Clostridium属、Klebsiella属、Enterobacter属、Caloramator属、Salmonella属、及びListeria属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、Lactobacillus属細菌に由来するグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子、特にLactobacillus reuteri由来のグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子、さらにLactobacillus reuteri JCM1112株及びLactobacillus reuteri ATCC 53608株由来のグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子が好ましい。

【0030】

Lactobacillus reuteri由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットのアミノ酸配列を配列番号1及び3に、ミディアムサブユニットのアミノ酸配列を配列番号5及び7に、スモールサブユニットのアミノ酸配列を配列番号9及び11に例示する。Lactobacillus reuteri由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号2及び4に、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号6及び8に、スモールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号10及び12に、例示する。

【0031】

各アミノ酸配列を含むタンパク質は、その他2種のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有する限り、各アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0032】

また、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズし、かつ、その他2種のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0033】

各サブユニットをコードする遺伝子は、同一の宿主で発現させる限り、同一のベクターに導入して形質転換を行ってもよいし、別々のベクターに導入して形質転換を行ってもよい。また、3種のサブユニットは、同一の種又は同一の株に由来するものを用いるのが好ましい。

【0034】

本発明の形質転換体は、プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子若しくは1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼコードする遺伝子のいずれか、又はその双方を含む。

【0035】

本発明において、プロパンジオールオキシドレダクターゼとは、当技術分野において通常いられる意味を有し、すなわち3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを還元し、プロパンジオールに変換する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質を意味する。

【0036】

プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、Lactobacillus属、Citrobacter属、Clostridium属、Klebsiella属、Enterobacter属、Caloramator属、Salmonella属、及びListeria属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、Lactobacillus属細菌に由来する1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、特にLactobacillus reuteri由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、さらにLactobacillus reuteri JCM1112株及びLactobacillus reuteri ATCC 53608株由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子が好ましい。

【0037】

配列番号13及び15にLactobacillus reuteri由来のプロパンジオールオキシドレダ

クターゼのアミノ酸配列を、配列番号14及び16に*Lactobacillus reuteri*由来のプロバンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有する限り、配列番号13又は15で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0038】

また、配列番号14又は16で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0039】

本発明において、1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼとは、当技術分野において通常用いられる意味を有し、すなわち3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを還元し、1,3-プロバンジオールに変換する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質を意味する。

【0040】

1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来する1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来の1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来の1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子が好ましい。

【0041】

配列番号17に*Lactobacillus reuteri*由来の1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼのアミノ酸配列を、配列番号18に*Lactobacillus reuteri*由来の1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質が1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有する限り、配列番号17で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0042】

また、配列番号18で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、1,3-プロバンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0043】

本発明の形質転換体は、グリセロールの3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド及び水への変換反応を触媒することにより失活したグリセロールデヒドラターゼ又はジオールデヒドラターゼにおける反応中心部分の補酵素B12を入れ替えて、再度活性を取り戻させる役割を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質としては、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子が挙げられる。グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、ラージサブユニット及びスモールサブユニットの2種のサブユニットから構成される。本発明の形質転換体には、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ならびにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子とジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもののいずれをも包含する。

【0044】

同様の作用を有するものであれば、特に制限なく使用できる。グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子としては、WO 98/21341; Daniel et al., J. Bacteriol., 177, 2151(1995); Toraya and Mori, J. Biol. Chem., 274, 3372(1999); 及び Tobimatsu et al., J. Bacteriol., 181, 4110(1999)に記載のものなどが挙げられる。

【0045】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子としては、一般に嫌気条件下でグリセロールを資化することのできる細菌群が有する *gdh* レギュロン、*pdu* オペロンと呼ばれる遺伝子群内に存在するものが含まれ、例えば、*gdrA*、*gdrB*、*pduG*、*pduH*、*ddrA*、*ddrB*、*dhaF*、*dhaG*、*orfZ*、及び *orfY* などが挙げられる。

【0046】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus* 属、*Citrobacter* 属、*Clostridium* 属、*Klebsiella* 属、*Enterobacter* 属、*Caloramator* 属、*Salmonella* 属、及び *Listeria* 属等に属する細菌に由来するものを使用することができ、本発明においては、*Lactobacillus* 属細菌に由来するグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子、特に *Lactobacillus reuteri* 由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子、さらに *Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子が好ましい。

【0047】

好ましくは、グリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む形質転換体は、少なくともグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含み、ジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む形質転換体は、少なくともジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む。

【0048】

Lactobacillus reuteri 由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットのアミノ酸配列を配列番号19及び21に、スモールサブユニットのアミノ酸配列を配列番号23及び25に例示する。*Lactobacillus reuteri* 由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号20及び22に、スモールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号24及び26に、例示する。

【0049】

各アミノ酸配列を含むタンパク質は、もう一方のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有する限り、各アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

【0050】

また、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、もう一方のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

【0051】

各サブユニットをコードする遺伝子は、同一の宿主で発現させる限り、同一のベクターに導入して形質転換を行ってもよいし、別々のベクターに導入して形質転換を行ってもよい。また、3種のサブユニットは、同一の種又は同一の株に由来するものを用いるのが好ましい。

【0052】

本明細書において、各配列番号で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じたアミノ酸配列とは、各配列番号で表されるアミノ酸配列の1個、又は好ましくは10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が欠失してもよく、又は各配列番号で表されるアミノ酸配列に1個、又は好ましくは、10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が付加してもよく、又は、各配列番号で表されるアミノ酸配列の1個、又は好ましくは、10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよいことを意味する。

【0053】

本明細書において、ストリンジェントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、すなわち、各遺伝子に対し高い相同性（相同性が90%以上、好ましくは95%以上）を有するDNAがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、このような条件は、0.5～1MのNaCl存在下42～68℃で、又は50%ホルムアミド存在下42℃で、又は水溶液中65～68℃で、ハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC（saline sodium citrate）溶液を用いて室温～68℃でフィルターを洗浄することにより達成できる。

【0054】

ここで、「一部の配列」とは、各遺伝子の塩基配列の一部を含むDNAの塩基配列であって、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズさせるのに十分な塩基配列の長さを有するもの、例えば、少なくとも50塩基、好ましくは少なくとも100塩基、より好ましくは少なくとも200塩基の配列である。

【0055】

なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutan-K（TAKARA社製）、Mutan-G（TAKARA社製））などを用いて、又は、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキットを用いて行うことができる。なお、上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、又は該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0056】

本発明においてアルデヒドデヒドロゲナーゼとは、当技術分野において通常用いられる意味を有し、すなわちアルデヒドを酸化してカルボン酸又はアシル基を生成する酵素活性を有するタンパク質を意味する。

【0057】

アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えば、Alcaligenes属、Aspergillus属、Bacillus属、Candida属、Chromobacterium属、Clostridium属、Corynebacterium属、Escherichia属、Lactobacillus属、Lactococcus属、Oceanobacillus属、Pichia属、Pseudomonas属、Rhizobium属、Rhodobacter属、Rhodococcus属、Saccharomyces属、Salmonella属、Sulfolobus属、Thermotoga属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。

【0058】

形質転換体の作成

本発明の形質転換体は、上記4種の遺伝子又はその一部を適当なベクターに連結し、得られた組換えベクターを本発明の遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。「一部」とは、宿主中に導入された場合に各遺伝子がコードするタンパク質を発現することができる各遺伝子の一部分を指す。

【0059】

バクテリアゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学の分野において周知である。例えば遺伝子の配列が既知の場合、制限エンドヌクレアーゼ消化により適したゲノム

ライブラリを作り、所望の遺伝子配列に相補的なプローブを用いてスクリーニングすることができる。配列が単離されたら、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（米国特許第4,683,202号）のような標準的増幅法を用いてDNAを増幅し、形質転換に適した量のDNAを得ることができる。

【0060】

本発明においては、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子、1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子及びアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子は、別々にベクターに導入して複数のベクターで形質転換を実施してもよいし、複数種の遺伝子を1つのベクターに導入して形質転換を行ってもよい。

【0061】

本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主細胞で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミドDNA、ファージDNA、コスミドDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えばpBR322、pSC101、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pACYC117、pBluescript IISK(+）、pETDuet-1、pACYCDuet-1等が挙げられ、ファージDNAとしては、例えばλgt10、Charon 4A、EMBL-、M13mp18、M13mp19等が挙げられる。

【0062】

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、*Ralstonia eutropha*などの*Ralstonia*属に属する細菌、*Pseudomonas putida*などの*Pseudomonas*属に属する細菌、*Bacillus subtilis*などの*Bacillus*属に属する細菌、大腸菌などの*Escherichia*属に属する細菌、*Saccharomyces cerevisiae*などの*Saccharomyces*属に属する酵母、*Candida maltosa*などの*Candida*属に属する酵母、COS細胞、CHO細胞、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などの動物細胞、SF9細胞などの昆虫細胞などが挙げられる。

【0063】

宿主細胞においては、グリセロールデヒドロゲナーゼを発現しない宿主細胞、すなわちグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を有しない細胞及びグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトした細胞を使用するのが好ましい。これらを用いることにより、グリセロールが酸化されてジヒドロキシアセトンに変換される経路を遮断することができ、より高い収率で1,3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。

【0064】

グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトした細胞とは、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されて発現できないような状況にある細胞を意味する。具体的には、該細胞は、細胞中のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を標的遺伝子として、標的遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（ターゲティングベクター）を用いて当該遺伝子を破壊する方法（ジーンターゲティング法）や、標的遺伝子の任意の位置にトラップベクター（プロモーターを持たないレポーター遺伝子）を挿入して当該遺伝子を破壊しその機能を失わせる方法（遺伝子トラップ法）、それらを組み合わせた方法等の通常当技術分野でノックアウト細胞、トランスジェニック動物（ノックアウト動物含む）等を作製する際に用いられる方法を用いて該細胞中のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することによって作製される。相同置換を起こす位置又はトラップベクターを挿入する位置は、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現の消失をもたらす変異を生じる位置であれば特に限定されないが、好ましくは転写調節領域、より好ましくは第2エクソンを置換する。またグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトする他の方法としては、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスcDNAを発現するベクタ

一を導入する方法や、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の2重鎖RNAを発現するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。当該ベクターとしては、ウイルスベクターやプラスミドベクター等が包含され、通常の遺伝子工学的手法に基づき、例えばMolecular cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い作製することができる。又、市販されているベクターを任意の制限酵素で切断し所望の遺伝子等を組み込んで半合成することもできる。

【0065】

グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子がロックアウトされているか否かは、該ベクターが導入された細胞についてサザンブロットを行い正しく相同組換えが起こっていることを確認することによって、ターゲティングベクターに宿主細胞が有しない薬剤耐性遺伝子を入れておき薬剤耐性の形質が組み込まれたものを選抜することによって、破壊導入後、選抜した株のゲノム、菌体、菌体培養液等をテンプレートにして、破壊するグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子のF側とR側のプライマーを用いてPCRをかけ、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子と破壊導入部位の配列を合わせた大きさのDNA断片の増幅を確認することによって、もしくはそれをクローニングして配列解析することによって、又はジヒドロキシアセトンが生成しないことを確認することによっても知ることができる。

【0066】

大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、組換えベクターが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、目的とするDNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917 (ATCC 37355) やRSF1010複製起点を有するpJRD215 (ATCC 37533) 等が挙げられる。

【0067】

プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1, 181 (1994)) やエレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0068】

酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYE p13、YC p50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、GAPプロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 192, 9-1933 (1978))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

【0069】

動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社) 等が用いられる。プロモーターとしては、例えば、SR α プロモーター、SV40プロモーター、CMVプロモーター等が挙げられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0070】

遺伝子の単離及び形質転換体の作成については、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。

【0071】

1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造

本発明において、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造は

、グリセロールの存在下、本発明の形質転換体を培養し、培養物（培養菌体又は培養上清）中に1，3－プロパンジオール及び3－ヒドロキシプロピオン酸を生成蓄積させ、該培養物から1，3－プロパンジオール及び3－ヒドロキシプロピオン酸を採取することにより実施できる。

【0072】

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って、炭素源としてグリセロールを用いることにより行われる。例えば、比較的リッチな培地、例えば2培地等を用いて好気培養し、菌体量を増やしてから嫌気条件にし、グリセロールを与えて発酵を行う。pHは、宿主の生育を妨害せず、かつ発酵液から酸を分離するときの障害とならない試薬を用いて調整する。炭酸ナトリウム、アンモニア、ナトリウムイオン供給源、例えば塩化ナトリウムを添加してもよい。また、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化アンモニウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、酢酸カリウム水溶液等の一般的なアルカリ試薬を用いてもよい。培養期間中pHは、5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5に保持する。

【0073】

窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイプリカー等が挙げられる。また、無機物としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0074】

培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）、インドールアクリル酸（IAA）等を培地に添加することができる。

【0075】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、30～40℃で1～30日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0076】

あるいは、上記において得られた形質転換体の培養物から遠心分離などによって集菌を行い、適当な緩衝液に懸濁する。この菌体懸濁液をグリセロールを含む緩衝液に懸濁し、反応を行うことによって、1，3－プロパンジオール及び3－ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。反応の条件は、例えば、反応温度は10～80℃、好ましくは15～50℃、反応時間は5分～96時間、好ましくは10分～72時間、pHは5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5である。

【0077】

また、該培養物の処理物を用いて反応を行うこともできる。該処理物としては、菌体破砕物、菌体破砕物又は培養上清から調製した粗酵素、精製酵素等が挙げられる。また、常法により担体に固定化した菌体、該処理物、酵素等を用いることができる。

【0078】

培養培地からの1，3－プロパンジオール及び3－ヒドロキシプロピオン酸の精製法は当該技術分野において周知である。例えば、有機溶媒を用いる抽出、蒸留及びカラムクロマトグラフィーに反応混合物を供することにより、培地から1，3－プロパンジオール及び3－ヒドロキシプロピオン酸を得ることができる（米国特許第5,356,812号）。また、限外濾過膜や水などの低分子のみが透過できるゼオライト分離膜などで発酵液の濃縮を行うのが好ましい。濃縮を行うことにより、水を蒸発させるためのエネルギーを低

減することができる。

【0079】

培地を高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）分析にかけることにより、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を直接同定することもできる。

【実施例】

【0080】

（実施例1）グリセロールデヒドラターゼ遺伝子の取得

合成オリゴヌクレオチドプライマー（フォワードプライマー：5'-ATGAAACGTCAAAAACGATTGAAGAACTAGAAAAAC-3'（配列番号27）、リバープライマー：5'-TTAGTTATCGCCCTTTAGCTTCTTACGACTTT-3'（配列番号28）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、以下の条件でPCR反応を実施した。

【0081】

PCR反応組成（ μ l）

10×Buffer	KOD plus	5
2mM	dNTPs	5
25mM	MgSO ₄	2
ゲノム	111ng / μ l	1
KOD plus		1
水		34
フォワードプライマー	20 pM	1
リバープライマー	20 pM	1

反応系体積 計 50

反応サイクル：94℃ 2分×1、94℃ 15秒、45～65℃ 30秒、68℃ 5分×30回、4℃ ∞。

【0082】

断片溶液にTaqプレミックスを等量加えて、72℃で10分、3' A-オーバーハング処理し、精製したサンプルをpCR4-TOPにTAクローニングした。シーケンサーはABIのPEISM310、3100を使用した。その結果、配列番号2で示されるグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、配列番号6で示されるグリセロールデヒドラターゼのミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、並びに配列番号10で示されるグリセロールデヒドラターゼのsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0083】

また、フォワードプライマー：5'-ATGAAACGTCAAAAACGTTTTGAAGAACTA-3'（配列番号29）、リバープライマー：5'-CTAGTTATCACCCCTTGAGCTTCTTT-3'（配列番号30）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、上記と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号4で示されるグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、配列番号8で示されるグリセロールデヒドラターゼのミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、並びに配列番号12で示されるグリセロールデヒドラターゼのsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0084】

（実施例2）プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGGGAGGCATAATTCCAATGGAAAAATA-3'（配列番号31）、リバープライマー：5'-TTAACGAATTATTGCTTCGTAAACCATCTTC-3'（配列番号32）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号14で示されるプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0085】

また、フォワードプライマー：5'-ATGGGAGGCATAATGCCGATG-3'（配列番号33）、リバ

ースプライマー：5'-TTAACGAATTATTGCTTCGTAAATCATCTTC-3'（配列番号34）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号16で示されるプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0086】

（実施例3）1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGAATAGACAATTTGATTTCTTAATGCCAAG-3'（配列番号35）、リバープライマー：5'-TTAGTAGATGCCATCGTAAGCCTTTT-3'（配列番号36）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号18で示される1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

【0087】

（実施例4）グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGGCAACTGAAAAAGTAATTGGTGTGATATT-3'（配列番号37）、リバープライマー：5'-TCACCTGTTTGCCATTTCTTAAAGGGATT-3'（配列番号38）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。配列番号20で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子、並びに配列番号24で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0088】

また、フォワードプライマー：5'-ATGGCAACTGAAAAAGTAATTGGTGTG-3'（配列番号39）、リバープライマー：5'-TCACCTGTTTACCATTTCCTTAAAGG-3'（配列番号40）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシーケンスを実施した。その結果、配列番号22で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子、並びに配列番号26で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のsmallサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

【0089】

（実施例5）1，3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造

(1) 組み換え微生物の作成

Novagen社のpETDuet-1ベクターのマルチクローニングサイト1に乳酸菌のグリセロールデヒドラターゼ遺伝子、マルチクローニングサイト2に1，3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子を導入したプラスミド1と、Novagen社のpACYCDuet-1ベクターのマルチクローニングサイト1にグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子遺伝子、マルチクローニングサイト2にアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子（大腸菌のaldB アクセッションナンバー L40742）を導入したプラスミド2をそれぞれ作成し、これをBL21（DE3）-RILに、Bio-RadのGENE PULSER IIエレクトロポレーションで導入した。

【0090】

(2) 組み換え微生物の培養

この菌株1μlを100μlの培養液に接種し、クロラムフェニコール100μg/ml、アンピシリン50μg/mlを含む2培地5ml（グリセロール40g/l、硫酸アンモニウム10g/l、KH₂PO₄ 2g/l、K₂HPO₄ 6g/l、酵母エキス40g/l、硫酸マグネシウム七水和物1g/l、消泡剤アデカノール20滴/l）で、37℃にて振とうしながら好気条件で、対数増殖後期（OD₆₆₀=5.0）まで培養した。この培養液1mlをとり、再度500mlの培養液（クロラムフェニコール100μg/ml、アンピシリン50μg/mlを含む2培地100ml）に植え継ぎ、37℃にて振とうしながら好気条件で、対数増殖後期（OD₆₆₀=5.0）まで培養した。

【0091】

ここでIPTGを1 mMとなるように投入し、2時間おいた。菌体を遠心分離で回収し、1 Mのグリセロール100 mlに加え、気相部を窒素に置換した100 mlボトルをボトルローラー上に37℃で5時間おき、その後、液を分析した。その結果、液中には1,3-プロパンジオールが0.4 M、3-ヒドロキシプロピオン酸が0.4 M含まれていた。

【配列表フリーテキスト】

【0092】

配列番号27～40：合成オリゴヌクレオチド

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

<120> Method for producing 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic acid

<130> P03-0958

<160> 40

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 558

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 1

Met	Lys	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Pro	Ile	His
1				5					10					15	

Gln	Asp	Thr	Phe	Val	Lys	Glu	Trp	Pro	Glu	Glu	Gly	Phe	Val	Ala	Met
			20					25					30		

Met	Gly	Pro	Asn	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Gly	Lys
		35					40					45			

Ile	Val	Glu	Met	Asp	Gly	Lys	Lys	Leu	Glu	Asp	Phe	Asp	Leu	Ile	Asp
	50					55					60				

Leu	Tyr	Ile	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ile	Asn	Ile	Asp	Asn	Val	Glu	Lys	Val
65					70					75					80

Met	Asn	Met	Asp	Ser	Thr	Lys	Ile	Ala	Arg	Met	Leu	Val	Asp	Pro	Asn
				85					90					95	

Val	Ser	Arg	Asp	Glu	Ile	Ile	Glu	Ile	Thr	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Ala
			100					105					110		

Lys	Ala	Glu	Glu	Ile	Ile	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Gly	Glu	Met	Ile	Met
		115					120					125			

Ala	Val	Lys	Lys	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Lys	Pro	Asp	Asn	Gln	Cys	His	
	130					135					140					
Val	Thr	Asn	Thr	Val	Asp	Asn	Pro	Val	Gln	Ile	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	
145					150					155					160	
Asp	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	Phe	Pro	Glu	Gln	Glu	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	
				165					170					175		
Ala	Arg	Tyr	Ala	Pro	Phe	Asn	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu	Ile	Gly	Ala	Gln	
			180					185					190			
Thr	Gly	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Gln	Cys	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Thr	
		195					200					205				
Glu	Leu	Gln	Leu	Gly	Met	Arg	Gly	Phe	Thr	Ala	Tyr	Ala	Glu	Thr	Ile	
	210					215					220					
Ser	Val	Tyr	Gly	Thr	Asp	Arg	Val	Phe	Thr	Asp	Gly	Asp	Asp	Thr	Pro	
225					230					235					240	
Trp	Ser	Lys	Gly	Phe	Leu	Ala	Ser	Cys	Tyr	Ala	Ser	Arg	Gly	Leu	Lys	
				245					250					255		
Met	Arg	Phe	Thr	Ser	Gly	Ala	Gly	Ser	Glu	Val	Leu	Met	Gly	Tyr	Pro	
			260					265					270			
Glu	Gly	Lys	Ser	Met	Leu	Tyr	Leu	Glu	Ala	Arg	Cys	Ile	Leu	Leu	Thr	
		275					280					285				
Lys	Ala	Ser	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Gln	Asn	Gly	Ala	Val	Ser	Cys	Ile	
	290					295					300					
Glu	Ile	Pro	Gly	Ala	Val	Pro	Asn	Gly	Ile	Arg	Glu	Val	Leu	Gly	Glu	
305					310					315					320	

Asn Leu Leu Cys Met Met Cys Asp Ile Glu Cys Ala Ser Gly Cys Asp
325 330 335

Gln Ala Tyr Ser His Ser Asp Met Arg Arg Thr Glu Arg Phe Ile Gly
340 345 350

Gln Phe Ile Ala Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ser Gly Tyr Ser Ser Thr
355 360 365

Pro Asn Tyr Asp Asn Thr Phe Ala Gly Ser Asn Thr Asp Ala Met Asp
370 375 380

Tyr Asp Asp Met Tyr Val Met Glu Arg Asp Leu Gly Gln Tyr Tyr Gly
385 390 395 400

Ile His Pro Val Lys Glu Glu Thr Ile Ile Lys Ala Arg Asn Lys Ala
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Gly Leu Pro Lys Ile
420 425 430

Thr Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Thr Tyr Ala Asn Thr His Asp Asp
435 440 445

Met Pro Lys Arg Asp Met Val Ala Asp Met Lys Ala Ala Gln Asp Met
450 455 460

Met Asp Arg Gly Ile Thr Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ala Leu Tyr Asn
465 470 475 480

His Gly Phe Lys Asp Val Ala Glu Ala Ile Leu Asn Leu Gln Lys Gln
485 490 495

Lys Val Val Gly Asp Tyr Leu Gln Thr Ser Ser Ile Phe Asp Lys Asp
500 505 510

Trp Asn Val Thr Ser Ala Val Asn Asp Gly Asn Asp Tyr Gln Gly Pro
515 520 525

Gly Thr Gly Tyr Arg Leu Tyr Glu Asp Lys Glu Glu Trp Asp Arg Ile
530 535 540

Lys Asp Leu Pro Phe Ala Leu Asp Pro Glu His Leu Glu Leu
545 550 555

<210> 2
<211> 1677
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 2
atgaaacgtc aaaaacgatt tgaagaacta gaaaaacggc caattcatca agatacattt 60
gttaaagaat ggccagaaga aggtttcgtt gcaatgatgg ggccctaatga ccctaagcct 120
agtgtaaaag ttgaaaatgg caagatcgta gagatggatg gtaaaaagct cgaagatttt 180
gatttgattg acttggtacat tgctaagtat ggaatcaata ttgacaacgt tgaaaaagtt 240
atgaatatgg attctaccaa gattgcacgg atgcttgttg atcctaattgt ttctcgtgat 300
gaaattattg aaattacatc agctttgact cctgctaagg ctgaagagat catcagtaag 360
cttgattttg gtgaaatgat tatggctgtc aagaagatgc gcccacgtcg taagcctgac 420
aaccagtgtc acgttaccaa tactgttgat aaccagttc aaattgctgc tgatgctgct 480
gatgccgctc ttcgtggatt tccagaacaa gaaaccacga cagctgtggc acgttatgca 540
ccattcaatg ctatttcaat tttaattggg gcacaaacag gtcgccctgg tgtattgaca 600
caatgttctg ttgaagaagc tactgaattg caattaggta tgcgtgggtt taccgcatat 660
gctgaaacca tttcagttta cgggtactgat cgtgtattta ccgatgggtga tgatactcca 720
tgggtctaaag gcttcttgge atcttgttat gcatcacgtg gtttgaagat gcgatttact 780
tcagggtgccg gttcagaagt ttgatgggt tatccagaag gtaagtcaat gctttacctt 840
gaagcgcgtt gtattttact tactaaggct tcagggtgtc aaggacttca aaatgggtgcc 900
gtaagttgta ttgaaattcc tgggtgctgtt cctaattggta ttcgtgaagt tctcggtgaa 960
aacttgttat gtatgatgtg tgacatcgaa tgtgcttctg gttgtgacca agcatactca 1020

cactccgata tgcggcggac tgaacgggtt attggtcaat ttattgccgg tactgattat 1080
attaactctg gttactcatc aactcctaac tacgataata ccttcgctgg ttcaaacact 1140
gatgctatgg actacgatga tatgtatgtt atggaacgtg acttgggtca atattatggt 1200
attcaccctg ttaaggaaga aaccattatt aaggcacgta ataaggccgc taaagccctt 1260
caagcagtat ttgaagatct tggattacca aagattactg atgaagaggc cgaagcagca 1320
acgtatgcta acacccatga tgacatgcca aagcgggata tggttgcaga tatgaaggct 1380
gctcaagata tgatggatcg tggaaattact gctattgata ttatcaaggc attgtacaac 1440
cacggattta aagatgtcgc tgaagcaatt ttgaaccttc aaaaacaaaa agttgttggt 1500
gattaccttc aaacatcttc tttttttgat aaagattgga acgtcacttc tgctgttaac 1560
gacggaaatg attatcaagg accaggtact ggataccgtc tataatgaaga caaggaagaa 1620
tgggatcggg ttaaagactt accattcgcc cttgatccag aacatttgga actgtag 1677

<210> 3
<211> 558
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 3

Met	Lys	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Pro	Ile	His
1				5					10					15	

Gln	Asp	Thr	Phe	Val	Lys	Glu	Trp	Pro	Glu	Glu	Gly	Phe	Val	Ala	Met
			20					25					30		

Met	Gly	Pro	Asn	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Gly	Lys
		35					40					45			

Ile	Val	Glu	Met	Asp	Gly	Lys	Lys	Arg	Glu	Asp	Phe	Asp	Leu	Ile	Asp
	50					55					60				

Leu	Tyr	Ile	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ile	Asn	Ile	Asp	Asn	Val	Glu	Lys	Val
65					70					75				80	

Met Asn Met Asp Ser Thr Lys Ile Ala Arg Met Leu Val Asp Pro Asn
85 90 95

Val Ser Arg Glu Ser Ile Ile Glu Ile Thr Ser Ala Leu Thr Pro Ala
100 105 110

Lys Ala Glu Glu Ile Ile Ser Lys Leu Asp Phe Gly Glu Met Ile Met
115 120 125

Ala Ile Lys Lys Met Arg Pro Arg Arg Lys Pro Asp Asn Gln Cys His
130 135 140

Val Thr Asn Thr Val Asp Asn Pro Val Gln Ile Ala Ala Asp Ala Ala
145 150 155 160

Asp Ala Ala Leu Arg Gly Phe Pro Glu Gln Glu Thr Thr Thr Ala Val
165 170 175

Ala Arg Tyr Ala Pro Phe Asn Ala Ile Ser Ile Leu Ile Gly Ala Gln
180 185 190

Thr Gly Arg Pro Gly Val Leu Thr Gln Cys Ser Val Glu Glu Ala Thr
195 200 205

Glu Leu Gln Leu Gly Met Arg Gly Phe Thr Ala Tyr Ala Glu Thr Ile
210 215 220

Ser Val Tyr Gly Thr Asp Arg Val Phe Thr Asp Gly Asp Asp Thr Pro
225 230 235 240

Trp Ser Lys Gly Phe Leu Ala Ser Cys Tyr Ala Ser Arg Gly Leu Lys
245 250 255

Met Arg Phe Thr Ser Gly Ala Gly Ser Glu Val Leu Met Gly Tyr Pro
260 265 270

Glu Gly Lys Ser Met Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Cys Ile Leu Leu Thr
275 280 285

Lys Ala Ser Gly Val Gln Gly Leu Gln Asn Gly Ala Val Ser Cys Ile
290 295 300

Glu Ile Pro Gly Ala Val Pro Asn Gly Ile Arg Glu Val Leu Gly Glu
305 310 315 320

Asn Leu Leu Cys Met Met Cys Asp Ile Glu Cys Ala Ser Gly Cys Asp
325 330 335

Gln Ala Tyr Ser His Ser Asp Met Arg Arg Thr Glu Arg Phe Ile Gly
340 345 350

Gln Phe Ile Ala Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ser Gly Tyr Ser Ser Thr
355 360 365

Pro Asn Tyr Asp Asn Thr Phe Ala Gly Ser Asn Thr Asp Ala Met Asp
370 375 380

Tyr Asp Asp Met Tyr Val Met Glu Arg Asp Leu Gly Gln Tyr Tyr Gly
385 390 395 400

Ile His Pro Val Gln Glu Glu Thr Ile Ile Lys Ala Arg Asn Lys Ala
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Gly Leu Pro Lys Ile
420 425 430

Thr Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Thr Tyr Ala Asn Thr His Asp Asp
435 440 445

Met Pro Lys Arg Asp Met Val Ala Asp Met Lys Ala Ala Gln Asp Met
450 455 460

Met Asp Arg Gly Ile Thr Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ala Leu Tyr Asn
465 470 475 480

His Gly Phe Lys Asp Val Ala Glu Ala Val Leu Asn Leu Gln Lys Gln
485 490 495

Lys Val Val Gly Asp Tyr Leu Gln Thr Ser Ser Ile Phe Asp Lys Asp
500 505 510

Trp Asn Ile Thr Ser Ala Val Asn Asp Gly Asn Asp Tyr Gln Gly Pro
515 520 525

Gly Thr Gly Tyr Arg Leu Tyr Glu Asp Lys Glu Glu Trp Asp Arg Ile
530 535 540

Lys Asp Leu Pro Phe Ala Leu Asp Pro Glu His Leu Glu Leu
545 550 555

<210> 4
<211> 1677
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 4
atgaaacgtc aaaaacgttt tgaagaacta gaaaagcggc caattcatca agatacatTT 60
gttaaggaat ggcctgaaga aggtttcgtt gcaatgatgg gtccaaatga cccgaagcca 120
agtgtaaagg ttgaaaacgg taaaattgtc gaaatggatg gcaagaagcg ggaagacttt 180
gacttaattg acctctacat tgctaagtat ggaattaata ttgataacgt tgaaaaagtt 240
atgaatatgg attcaactaa aattgcacgg atgttggttg atccaaatgt ctcacgtgaa 300
tccatcattg aaattacttc tgcactaact ccagcgaag cgaagaaat cattagtaag 360
cttgactttg gtgaaatgat tatggctatc aagaagatgc gtccgcgtcg gaagccggat 420
aaccaatgtc acgttaccaa cacggttgat aaccagttc aaattgctgc tgatgctgct 480
gatgctgcgc ttcgtggttt ccagaacaa gaaactacta ctgccgttgc ccgttatgca 540
ccatttaatg ctatttcaat cttaatgggt gctcaaacag gtcgtcctgg tgtattaaca 600
caatgttctg ttgaagaagc aaccgaattg caattaggaa tgcgtggctt taccgcttat 660
gctgaaacta tttcagttta tgggtactgac cgggtattta ctgatgggtga tgatacacca 720

tggtctaaag gattccttgc atcatgttat gcatcgcgtg gtttgaagat gcggtttact	780
tcagggtgctg gttcagaagt ttatgatgggt taccacagaag gtaagtcaat gttatatctt	840
gaagcacggtt gtattttact taccaaggct tcagggtgttc aaggacttca aaacggtgcc	900
gtaagttgta ttgaaattcc aggtgctgtt cctaacggta tccgtgaagt tcttggtgaa	960
aacctattat gtatgatgtg tgatattgaa tgtgcttctg gttgtgacca agcatactca	1020
cactcagata tgcggcgctac tgaacgggtt attgggtcaat ttattgccgg tactgattac	1080
attaattctg gttactcatc aactcctaac tacgataaca cctttgctgg ttcaaacacc	1140
gatgcaatgg actacgatga catgtatgtt atggaacgtg acttaggtca atactatggt	1200
attcaccag ttcaagaaga aacaattatt aaggctcgta acaaggctgc taaggcatta	1260
caagctgtat ttgaagatct tggactacct aagattactg atgaagaagt tgaagctgct	1320
acatatgcta acactcatga tgacatgcca aaacgtgaca tggttgcaga tatgaaagcc	1380
gctcaagata tgatggatcg tggcattact gctattgata ttattaaggc tctttataac	1440
catggattta aggatgttgc tgaagctgta ttgaaccttc aaaagcaaaa ggttgtcggt	1500
gattaccttc aaacttcac aatctttgac aaggattgga atatcacttc tgccgtaaat	1560
gacgggaatg actaccaagg tccaggctact ggataccgtc tataatgaaga caaggaagaa	1620
tgggatcgaa tcaaagatct tccattcgca cttgatccag aacacttgga actatag	1677

<210> 5
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus reuteri

<400> 5

Met	Ala	Asp	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Val	Lys	Glu	Val
1				5					10					15	

Leu	Ser	Glu	Thr	Asn	Gln	Ile	Asp	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Asp	Lys	Ser
			20					25					30		

Asn	Asp	Ser	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Gln	Glu	Val	Gln	Gln	Pro	Asn	Ser
		35					40					45			

<210> 6
<211> 711
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 6
atggctgata ttgatgaaaa cttattacgt aaaatcgta aagaagtttt aagcgaaact 60
aatcaaaticg atactaagat tgactttgat aaaagtaatg atagtactgc aacagcaact 120
caagagggtgc aacaaccaaa tagtaaagct gttccagaaa agaaacttga ctggttccaa 180
ccagttggag aagcaaaacc tggatatctt aaggatgaag ttgtaattgc agtcggtcct 240
gcattcgcaa ctgttcttga taagacagaa actgggtattc ctcataaaga agtgcttcgt 300
caagttattg ctgggtattga agaagaaggg cttaaggcgc gggtagttaa agtttaccgg 360
agttcagatg tagcattctg tgctgtccaa ggtgatacc tttctgggtc aggaattgct 420
attgggtatcc aatcaaaaagg gacgacagtt attcaccaaa aggatcaaga ccctcttggt 480
aaccttgagt tattcccaca agcgccagta cttactcccg aaacttatcg tgcaattggt 540
aagaatgccg ctatgtatgc taagggtgaa tctccagAAC cagttccagc taaaaacgat 600
caacttgctc gtattcacta tcaagctatt tcagcaatta tgcataattcg tgaaactcac 660
caagttgttg ttggtaagcc tgaagaagaa attaaggtta cgtttgatta a 711

<210> 7
<211> 236
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 7

Met	Ala	Asp	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Val	Lys	Glu	Val
1				5					10					15	
Leu	Asn	Glu	Thr	Asn	Gln	Ile	Asp	Thr	Lys	Ile	Asn	Phe	Asp	Lys	Glu
			20					25					30		
Asn	Asn	Ser	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Glu	Glu	Val	Gln	Gln	Pro	Asn	Ser
		35					40					45			

Lys Ala Val Pro Glu Lys Lys Leu Asp Trp Phe Gln Pro Ile Gly Glu
50 55 60

Ala Lys Pro Gly Tyr Ser Lys Asp Glu Val Val Ile Ala Val Gly Pro
65 70 75 80

Ala Phe Ala Thr Val Leu Asp Lys Thr Glu Thr Gly Ile Pro His Lys
85 90 95

Glu Val Leu Arg Gln Val Ile Ala Gly Ile Glu Glu Glu Gly Leu Lys
100 105 110

Ala Arg Val Val Lys Val Tyr Arg Ser Ser Asp Val Ala Phe Cys Ala
115 120 125

Val Gln Gly Asp His Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Ile Gly Ile Gln
130 135 140

Ser Lys Gly Thr Thr Val Ile His Gln Lys Asp Gln Asp Pro Leu Gly
145 150 155 160

Asn Leu Glu Leu Phe Pro Gln Ala Pro Val Leu Thr Pro Glu Thr Phe
165 170 175

Arg Ala Ile Gly Lys Asn Ala Ala Met Tyr Ala Lys Gly Glu Ser Pro
180 185 190

Glu Pro Val Pro Ala Lys Asn Asp Gln Leu Ala Arg Ile His Tyr Gln
195 200 205

Ala Ile Ser Ala Ile Met His Ile Arg Glu Thr His Gln Val Val Val
210 215 220

Gly Lys Pro Glu Glu Glu Ile Lys Val Thr Phe Asp
225 230 235

<210> 8

<211> 711

<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 8
atggctgata tcgatgaaaa tttaattcgt aagatcgta aagaagtttt aaacgagact 60
aatcaaattg atactaagat caattttgac aaggaaaata atagtaccgc aactgctact 120
gaagaagttc aacaacccaaa cagcaaggca gttcctgaaa agaaacttga ttggttccaa 180
ccaattggcg aagcaaaacc aggggtactca aaggatgaag ttgtaatcgc agttggtcct 240
gcctttgcaa cagttctaga taaaacagaa actgggattc ctcataaaga ggtacttcgt 300
caagtaattg ccggaattga agaagaggga cttaaagcac gagtagttaa agtctatcgt 360
tcatcagacg ttgctttctg tgctgttcag ggtgaaccact tatctggttc aggaattgca 420
attggaatcc aatctaaggg aacaactggt attcaccaaa aagaccagga tccattagga 480
aacctagaat tattcccaaca agctccgggt cttacaccag aaactttccg ggcaattggg 540
aagaatgcag caatgtacgc taaagggtgaa tctccagaac cagttccagc taagaacgat 600
caacttgctc gtattcacta ccaagctatt tcagcaatta tgcataattcg tgaaactcac 660
caagttgttg ttggaaagcc tgaagaagaa atcaaagtta cgttcgatta a 711

<210> 9
<211> 172
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 9
Met Met Ser Glu Val Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Met Ala Gln Met
1 5 10 15
Gly Asn Ser Ser Ser Ala Asn Ser Ser Thr Gly Thr Ser Thr Ala Ser
20 25 30
Thr Ser Lys Glu Met Thr Ala Asp Asp Tyr Pro Leu Tyr Gln Lys His
35 40 45
Arg Asp Leu Val Lys Thr Pro Lys Gly His Asn Leu Asp Asp Ile Asn
50 55 60

Leu Gln Lys Val Val Asn Asn Gln Val Asp Pro Lys Glu Leu Arg Ile
65 70 75 80

Thr Pro Glu Ala Leu Lys Leu Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Ala Gly
85 90 95

Arg Pro Ala Ile Gln Lys Asn Leu Gln Arg Ala Ala Glu Leu Thr Arg
100 105 110

Val Pro Asp Glu Arg Val Leu Glu Met Tyr Asp Ala Leu Arg Pro Phe
115 120 125

Arg Ser Thr Lys Gln Glu Leu Leu Asn Ile Ala Lys Glu Leu Arg Asp
130 135 140

Lys Tyr Asp Ala Asn Val Cys Ala Ala Trp Phe Glu Glu Ala Ala Asp
145 150 155 160

Tyr Tyr Glu Ser Arg Lys Lys Leu Lys Gly Asp Asn
165 170

<210> 10
<211> 519
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 10
atgatgagtg aagttgatga tttagtagca aagatcatgg ctcagatggg aaacagttca 60
tctgctaata gctctacagg tacttcaact gcaagtacta gtaaggaaat gacagcagat 120
gattaccacac tttatcaaaa gcaccgtgat ttagtaaaaa caccaaaagg acacaatctt 180
gatgacatca atttaca aaa agtagtaaat aatcaagttg atcctaagga attacggatt 240
acaccagaag cattgaaact tcaagggtgaa attgcagcta atgctggccg tccagctatt 300
caaaagaatc ttcaacgagc tgcagaatta acacgagtac ctgacgaacg ggttcttgaa 360
atgtatgatg cattgcgtcc tttccgttca actaagcaag aattattgaa cattgcaaag 420

gaattacggg acaagtatga cgctaattgtt tgcgcagcat ggtttgaaga agctgctgat 480

tattatgaaa gtcgtaagaa gctaaagggc gataactaa 519

<210> 11

<211> 171

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 11

Met Ser Glu Val Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Met Ala Gln Met Gly
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Ser Ala Thr Ser Thr Asn Asn
20 25 30

Gly Lys Glu Met Thr Ala Asp Asp Tyr Pro Leu Tyr Gln Lys His Arg
35 40 45

Asp Leu Val Lys Thr Pro Ser Gly Lys Lys Leu Asp Asp Ile Thr Leu
50 55 60

Gln Lys Val Val Asn Asp Gln Val Asp Pro Lys Glu Leu Arg Ile Thr
65 70 75 80

Pro Glu Ala Leu Lys Leu Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Ala Gly Arg
85 90 95

Pro Ala Ile Gln Lys Asn Leu Gln Arg Ala Ala Glu Leu Thr Arg Val
100 105 110

Pro Asp Glu Arg Val Leu Gln Met Tyr Asp Ala Leu Arg Pro Phe Arg
115 120 125

Ser Thr Lys Gln Glu Leu Leu Asp Ile Ala Asn Glu Leu Arg Asp Lys
130 135 140

Tyr His Ala Glu Val Cys Ala Ala Trp Phe Glu Glu Ala Ala Asn Tyr
145 150 155 160

Tyr Glu Ser Arg Lys Lys Leu Lys Gly Asp Asn
165 170

<210> 12
<211> 516
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 12
atgagtgaag ttgatgattt agtagcaaag atcatggcac agatgggaaa tagctcatct 60
tccgatagtt caacaagtgc tacttcaaca aataacggta aggaaatgac agcagatgac 120
tatectcttt accaaaagca ccgtgattta gtaaagacac cateaggaaa gaaacttgat 180
gatattactt tacaaaaggt tgtaaatgat caagttgac caaaagaatt acggattact 240
ccagaagcat taaaacttca aggtgagatc gcagcaaacg ctggtcggcc agcaattcaa 300
aagaacttac aacgggcagc tgaattaaca cgtgttcag acgaacgtgt tttgcaaattg 360
tatgatgcat tacggccatt ccgttcaacg aagcaagaat tactagatat tgctaattgaa 420
ctccgtgata aatatcatgc agaagtatgt gcagcttggf ttgaagaagc tgcaaattac 480
tatgaaagtc gaaagaagct caagggatgat aactag 516

<210> 13
<211> 379
<212> PRT
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 13

Met Gly Gly Ile Ile Pro Met Glu Lys Tyr Ser Met Pro Thr Arg Ile
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Glu Thr Leu Asn Asn Glu
20 25 30

Arg Ile Leu Leu Val Cys Asp Ser Phe Leu Pro Gly Ser Asp Thr Leu
35 40 45

Lys Glu Ile Glu Ser His Ile Lys Asp Asn Asn Lys Cys Glu Ile Phe
50 55 60

Ser Asp Val Val Pro Asp Pro Pro Leu Asp Lys Ile Met Glu Gly Val
65 70 75 80

Gln Gln Phe Leu Lys Leu Lys Pro Thr Ile Val Ile Gly Ile Gly Gly
85 90 95

Gly Ser Ala Leu Asp Thr Gly Lys Gly Ile Arg Phe Phe Gly Glu Lys
100 105 110

Leu Gly Lys Cys Lys Ile Asn Glu Tyr Ile Ala Ile Pro Thr Thr Ser
115 120 125

Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Asn Thr Ala Val Ile Ser Asp Thr Lys
130 135 140

Glu His Arg Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asp Tyr Leu Thr Pro Asp Cys
145 150 155 160

Ala Leu Leu Asp Pro Lys Leu Val Met Thr Ala Pro Lys Ser Val Thr
165 170 175

Ala Tyr Ser Gly Met Asp Val Leu Thr His Ala Leu Glu Ser Leu Val
180 185 190

Ala Lys Asp Ala Asn Leu Phe Thr Val Ala Leu Ser Glu Glu Ala Ile
195 200 205

Asp Ala Val Ile Lys His Leu Val Glu Cys Tyr Arg His Gly Asp Asn
210 215 220

Val Asp Ala Arg Lys Ile Val His Glu Ala Ser Asn Ile Ala Gly Thr
225 230 235 240

Ala Phe Asn Ile Ala Gly Leu Gly Ile Cys His Ser Ile Ala His Gln
245 250 255

Leu Gly Ala Asn Phe His Val Pro His Gly Leu Ala Asn Thr Met Leu
260 265 270

Leu Pro Tyr Val Ile Ala Tyr Asn Ala Glu His Ser Glu Glu Ala Leu
275 280 285

His Lys Phe Ala Ile Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Ala Ala Pro Gly
290 295 300

Val Gly Asp Arg Leu Ala Val Lys Arg Leu Ile Ala Lys Ile Arg Glu
305 310 315 320

Met Ala Arg Gln Met Asn Cys Pro Met Thr Leu Gln Ala Phe Gly Val
325 330 335

Asp Pro Ala Lys Ala Glu Glu Leu Ala Asp Thr Val Val Ala Asn Ala
340 345 350

Lys Lys Asp Ala Thr Phe Pro Gly Asn Pro Val Val Pro Ser Asp Asn
355 360 365

Asp Leu Lys Met Val Tyr Glu Ala Ile Ile Arg
370 375

<210> 14

<211> 1140

<212> DNA

<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 14

atgggaggca taattccaat ggaaaaatat agtatgccaa cccggattta ttcgggaaca 60
gatagtttga aagaactaga gacacttaat aatgaacgta ttttattagt ctgtgattct 120
ttcttgccctg gtagtgatac cttaaaagaa attgagagtc acattaagga taataataag 180
tgtgaaattt tctctgatgt tgtccccgat cctccactag ataagattat ggaaggggtt 240
caacaattcc ttaaaacttaa accaacaatt gtgattggta tcggtggcgg atcagctttg 300

gatactggta aggggaattcg ttctctttggt gaaaagttgg gcaagtgc aa gatcaatgaa 360
tatattgcta ttccaacaac gagtgggtact ggttcagaag ttacgaatac tgcgggttatt 420
tctgatacga aagaacatcg taaaattcct attttggag attatttgac acctgattgt 480
gctttactag atcctaaact agttatgact gctcctaaga gtgtaactgc atattcagga 540
atggatgttt taacacatgc acttgaatct ttggttgcta aggatgc aaa tttattcaca 600
gttgcat tat cagaagaagc aattgatgcc gttattaaac atttagttga gtgttatcgt 660
cacggcgata atgtgggatgc tcgtaagatt gttcatgaag catcaaatat tgccgggaact 720
gcatttaata ttgctggatt agggatttgc cactcaattg cgcatacaatt gggagctaata 780
ttccacgttc cccatgggttt agcaaataca atgctcttgc cataatgttat cgcataataat 840
gctgaacata gtgaagaggc attgcataag tttgcaattg ctgctaagaa agctggaatt 900
gctgctcctg gagtaggcga tcgtcttgca gtaaagcgac taattgctaa aattagggaa 960
atggcacgac aaatgaattg tccaatgact cttcaagcat tcgggtgttga tcctgctaaa 1020
gctgaagaat tagctgatac tgttgttgca aatgcgaaga aagatgc aac attccctggc 1080
aatccagttg ttccttcaga taatgatctg aagatgggtt acgaagcaat aattcgttaa 1140

<210> 15
<211> 379
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 15

Met	Gly	Gly	Ile	Met	Pro	Met	Glu	Lys	Phe	Ser	Met	Pro	Thr	Arg	Ile
1				5					10					15	

Tyr	Ser	Gly	Thr	Asp	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu	His	Asn	Glu
			20					25					30		

Arg	Ile	Leu	Leu	Val	Cys	Asp	Ser	Phe	Leu	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu
		35					40					45			

Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	His	Ile	Asn	Asp	Ser	Asn	Lys	Cys	Glu	Ile	Phe
50						55					60				

Ser	Asp	Val	Val	Pro	Asp	Pro	Pro	Leu	Asp	Lys	Ile	Met	Glu	Gly	Val	
65					70					75					80	
Gln	Gln	Phe	Leu	Lys	Leu	Lys	Pro	Thr	Ile	Val	Ile	Gly	Ile	Gly	Gly	
				85					90					95		
Gly	Ser	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Lys	Gly	Ile	Arg	Phe	Phe	Gly	Glu	Lys	
			100					105					110			
Leu	Gly	Lys	Cys	Lys	Ile	Asn	Glu	Tyr	Ile	Ala	Ile	Pro	Thr	Thr	Ser	
		115					120					125				
Gly	Thr	Gly	Ser	Glu	Val	Thr	Asn	Thr	Ala	Val	Ile	Ser	Asp	Thr	Lys	
	130					135					140					
Glu	His	Arg	Lys	Ile	Pro	Ile	Leu	Glu	Asp	Tyr	Leu	Thr	Pro	Asp	Cys	
145					150					155					160	
Ala	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Val	Met	Thr	Ala	Pro	Lys	Ser	Val	Thr	
				165					170					175		
Ala	Tyr	Ser	Gly	Met	Asp	Val	Leu	Thr	His	Ala	Leu	Glu	Ser	Leu	Val	
			180					185					190			
Ala	Lys	Asp	Ala	Asn	Leu	Phe	Thr	Val	Ala	Leu	Ser	Glu	Glu	Ala	Ile	
		195					200					205				
Asp	Ala	Val	Thr	Lys	Tyr	Leu	Val	Glu	Cys	Tyr	Arg	His	Gly	Asp	Asn	
	210					215					220					
Val	Asp	Ala	Arg	Lys	Ile	Val	His	Glu	Ala	Ser	Asn	Ile	Ala	Gly	Thr	
225					230					235					240	
Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Cys	His	Ser	Ile	Ala	His	Gln	
				245					250					255		

Leu Gly Ala Asn Phe His Val Pro His Gly Leu Ala Asn Thr Met Leu
260 265 270

Leu Pro Tyr Val Val Ala Tyr Asn Ala Glu His Cys Glu Glu Ala Leu
275 280 285

His Lys Phe Ala Ile Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Ala Ala Pro Gly
290 295 300

Val Gly Asp Arg Leu Ala Val Lys Arg Leu Ile Ala Lys Ile Arg Glu
305 310 315 320

Met Ala Arg Gln Met Asn Cys Pro Met Thr Leu Gln Ala Phe Gly Val
325 330 335

Asp His Ala Lys Ala Glu Ala Ala Ala Asp Thr Val Val Ala Asn Ala
340 345 350

Lys Lys Asp Ala Thr Phe Pro Gly Asn Pro Val Val Pro Ser Asp Asp
355 360 365

Asp Leu Lys Met Ile Tyr Glu Ala Ile Ile Arg
370 375

<210> 16
<211> 1140
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 16
atgggaggca taatgccgat ggaaaaattt agtatgccaa cccgaattta ttcgggaaca 60
gatagtttga aggaattaga aacccttcat aatgaacgaa ttttgttagt ttgtgactca 120
ttcttacctg gtagtgacac attaaaggaa attgagagtc atattaacga cagtaataaa 180
tgtgaaattt tctctgatgt tgtccctgat ccaccactag ataaaattat ggaaggggtt 240
caacagttct taaagctgaa accaacaatt gtaattggta tcggtgggtgg ttctgcaatg 300
gacaccggtg agggaaattcg tttcttcggt gaaaagcttg gcaagtgcga aattaatgaa 360

tatatattgcaa ttccaacaac cagcgggaacc ggttcagaag ttactaatac tgcgggttatt 420

tctgatacta aggaacacccg gaagattccg attcttgaag attacttaac accagattgt 480

gcattgcttg atcctaagtt agtaatgaca gcaccaaaga gtgttactgc ctactcagga 540

atggatgtat taactcatgc tcttgaatca ttggttgcta aggacgctaa tttgtttacc 600

gttgcatfat cagaagaagc cattgatgcg gtaactaagt atcttgttga atgttatcgt 660

catggcgata atgtcgatgc acgaaagatc gttcacgaag catcaaatat tgccgggaaca 720

gccctttaaca ttgctggact aggtatttgc cactcaattg cccaccaatt aggtgctaac 780

ttccatgttc ctcatgggtt agcaaacaca atgtttattgc catatgttgt tgcatacaat 840

gctgaacact gtgaagaagc cttacacaag tttgcaattg ccgctaagaa agccgggaatt 900

gctgcacctg gcgttgggtga ccgtttggct gttaagcggc tgattgcaaa gattcgtgaa 960

atggcacggc aaatgaattg tccaatgact ctccaagcat ttggagttga ccacgcacaaa 1020

gcagaagcag ctgctgatac ggttgttgct aatgcgaaga aggatgcaac attcccaggc 1080

aateccagttg ttccttcaga tgatgatctg aagatgattt acgaagcaat aattcgttaa 1140

<210> 17

<211> 390

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 17

Met Asn Arg Gln Phe Asp Phe Leu Met Pro Ser Val Asn Phe Phe Gly
1 5 10 15

Pro Gly Val Ile Ala Lys Ile Gly Asp Arg Ala Lys Met Leu Asn Met
20 25 30

His Lys Pro Leu Ile Val Thr Thr Glu Gly Leu Ser Lys Ile Asp Asn
35 40 45

Gly Pro Val Lys Gln Thr Val Ala Ser Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp
50 55 60

Tyr Ala Val Phe Thr Gly Ala Glu Pro Asn Pro Lys Ile Arg Asn Val
65 70 75 80

Gln Ala Gly Lys Lys Met Tyr Gln Asp Glu Asn Cys Asp Ser Ile Ile
85 90 95

Thr Val Gly Gly Gly Ser Ala His Asp Cys Gly Lys Gly Ile Gly Ile
100 105 110

Val Leu Thr Asn Gly Asp Asp Ile Ser Lys Leu Ala Gly Ile Glu Thr
115 120 125

Leu Lys Asn Pro Leu Pro Pro Leu Met Ala Val Asn Thr Thr Ala Gly
130 135 140

Thr Gly Ser Glu Leu Thr Arg His Ala Val Ile Thr Asn Glu Lys Thr
145 150 155 160

His Leu Lys Phe Val Val Val Ser Trp Arg Asn Ile Pro Leu Val Ser
165 170 175

Phe Asn Asp Pro Met Leu Met Leu Asp Ile Pro Lys Asp Ile Thr Ala
180 185 190

Ala Thr Gly Cys Asp Ala Phe Val Gln Ala Ile Glu Pro Tyr Val Ser
195 200 205

Val Asp His Asn Pro Ile Thr Asp Ser Gln Cys Lys Glu Ala Ile Gln
210 215 220

Leu Ile Gln Thr Ala Leu Pro Glu Val Val Ala Asn Gly His Asn Ile
225 230 235 240

Glu Ala Arg Thr Lys Met Val Glu Ala Glu Met Leu Ala Gly Met Ala
245 250 255

Phe Asn Asn Ala Asn Leu Gly Tyr Val His Ala Met Ala His Gln Leu
260 265 270

Gly Gly Gln Tyr Asp Ala Pro His Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu
275 280 285

Thr Thr Val Glu Glu Tyr Asn Leu Ile Ala Cys Pro Glu Arg Phe Ala
290 295 300

Glu Leu Ala Lys Val Met Gly Phe Asp Thr Thr Gly Leu Thr Leu Tyr
305 310 315 320

Glu Ala Ala Gln Lys Ser Ile Asp Gly Met Arg Glu Met Cys Arg Leu
325 330 335

Val Gly Ile Pro Ser Ser Ile Lys Glu Ile Gly Ala Lys Pro Glu Asp
340 345 350

Phe Glu Met Met Ala Lys Asn Ala Leu Lys Asp Gly Asn Ala Phe Ser
355 360 365

Asn Pro Arg Lys Gly Thr Val Glu Asp Ile Val Lys Leu Tyr Gln Lys
370 375 380

Ala Tyr Asp Gly Ile Tyr
385 390

<210> 18
<211> 1173
<212> DNA
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 18
atgaatagac aatttgattt cttaatgcca agtgtgaact tctttgggtcc tgggtgttatt 60
gctaaaattg gtgatcgtgc aaagatgctc aatatgcaca aaccattgat tgttactact 120
gaagggtttat ccaagattga caatggctct gtaaagcaaa ccgttgcttc attggaaaag 180
gctggcgttg actatgccgt atttactggc gctgaacctt accctaagat ccggaatgtt 240
caagctggta aaaagatgta ccaagatgaa aactgtgact caattattac tgttgggtggg 300

```

ggttctgctc acgactgtgg taagggatc ggtattgttt taactaacgg tgatgacatt 360
tccaagcttg ccggaattga aacattgaag aatccacttc caccattgat ggctgttaac 420
actactgccg gaactgggtc tgaattaaact cgtcacgctg ttattactaa cgaaaagact 480
catttgaagt ttgttgttgt ttcattggcgt aacattccat tggatcatt caacgatcca 540
atgttgatgc ttgatattcc aaaagacatt accgctgcta ctggttgtga tgcttttgtt 600
caggctattg aaccatacgt ttcgtttgac cataacccaa ttactgatag tcaatgtaaa 660
gaagctattc aattaattca aactgcttta ccagaagtag ttgctaattgg tcacaatatt 720
gaagcacgga ctaagatggg tgaagctgaa atgcttgccg gaatggcctt caataatgcc 780
aacttaggct atgttcacgc aatggctcac caactcgggtg gtcaatatga tgctcctcat 840
gggtgtttgct gtgccttgct cttgaccact gttgaagaat ataacttaat cgcattgtcca 900
gagcgggtttg ctgaattggc taaggtaatg ggctttgaca ctactggctc taccctttac 960
gaagcagcac aaaagtcaat tgacgggatg cgtgaaatgt gccggcttgt tggatttcca 1020
tcatcaatca aggaaattgg tgctaagcca gaagactttg aaatgatggc caagaatgcc 1080
ctcaaggatg gtaatgcctt ctctaaccce cgtaagggtg ctgttgaaga tattgtaaag 1140
ctttatcaaa aggcttacga tggcatctac taa 1173

```

<210> 19

<211> 616

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 19

```

Met Ala Thr Glu Lys Val Ile Gly Val Asp Ile Gly Asn Ser Ser Thr
1          5          10          15

```

```

Glu Val Ala Leu Ala Asp Val Ser Asp Ser Gly Gln Val His Phe Ile
20          25          30

```

```

Asn Ser Gly Ile Ala Pro Thr Thr Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gln Asn
35          40          45

```

Leu Val Gly Ile Arg Asp Ser Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Asn
50 55 60

Leu Thr Ile Asp Asp Ile Asp Leu Ile Arg Ile Asn Glu Ala Thr Pro
65 70 75 80

Val Ile Gly Asp Val Ala Met Glu Thr Ile Thr Glu Thr Val Val Thr
85 90 95

Glu Ser Thr Met Ile Gly His Asn Pro Asn Thr Pro Gly Gly Ile Gly
100 105 110

Thr Gly Ala Gly Ile Thr Val Arg Leu Leu Asp Leu Leu Lys Lys Thr
115 120 125

Asp Lys Ser Lys Asn Tyr Ile Val Val Val Pro Lys Asp Ile Asp Phe
130 135 140

Glu Asp Val Ala Lys Leu Ile Asn Ala Tyr Val Ala Ser Gly Tyr Lys
145 150 155 160

Ile Thr Ala Ala Ile Leu Arg Asn Asp Asp Gly Val Leu Val Asp Asn
165 170 175

Arg Leu Asn His Lys Ile Pro Ile Val Asp Glu Val Ala Met Ile Asp
180 185 190

Lys Val Pro Leu Asn Met Leu Ala Ala Val Glu Val Ala Gly Pro Gly
195 200 205

Gln Val Ile Ser Gln Leu Ser Asn Pro Tyr Gly Ile Ala Thr Leu Phe
210 215 220

Gly Leu Thr Pro Glu Glu Thr Lys Asn Ile Val Pro Val Ser Arg Ala
225 230 235 240

Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Val Val Ile Lys Thr Pro Ala Gly Asp
245 250 255

Val	Lys	Ala	Arg	Val	Ile	Pro	Ala	Gly	Lys	Ile	Ile	Ile	Asn	Gly	Asp		
			260					265					270				
Thr	Gly	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Asp	Ala	Ile	Met		
		275					280					285					
Lys	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Arg	His	Ile	Asn	Asn	Ile	Thr	Gly	Glu	Ser		
	290					295					300						
Gly	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Met	Leu	Glu	Asn	Val	Arg	Gln	Thr	Met	Ala		
305					310					315					320		
Asp	Leu	Thr	Gly	Lys	Lys	Asn	Asp	Glu	Ile	Ala	Ile	Gln	Asp	Leu	Leu		
				325					330					335			
Ala	Val	Asp	Thr	Gln	Val	Pro	Val	Glu	Val	Arg	Gly	Gly	Leu	Ala	Gly		
			340					345					350				
Glu	Phe	Ser	Asn	Glu	Ser	Ala	Val	Gly	Ile	Ala	Ala	Met	Val	Lys	Ser		
		355					360					365					
Asp	His	Leu	Gln	Met	Glu	Val	Ile	Ala	Lys	Leu	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe		
	370						375				380						
Asn	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Gly	Gly	Ala	Glu	Val	Glu	Ser	Ala	Ile	Arg		
385					390					395					400		
Gly	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Gly	Thr	Asp	Lys	Pro	Ile	Ala	Ile	Leu	Asp		
				405					410					415			
Leu	Gly	Ala	Gly	Ser	Thr	Asp	Ala	Ser	Ile	Ile	Asn	Lys	Glu	Asn	Asn		
			420					425					430				
Thr	Val	Ala	Ile	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Gly	Asp	Met	Val	Thr	Met	Ile		
		435					440					445					

Ile Asn Ser Glu Leu Gly Leu Asn Asp Ile His Leu Ala Glu Asp Ile
450 455 460

Lys Arg Tyr Pro Leu Ala Lys Val Glu Asn Leu Phe Gln Ile Arg His
465 470 475 480

Glu Asp Gly Ser Val Gln Phe Phe Lys Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu
485 490 495

Phe Ala Lys Val Val Val Ile Lys Pro Asp Gly Tyr Glu Pro Val Thr
500 505 510

Gly Asn Pro Ser Ile Glu Lys Ile Lys Leu Val Arg Gln Ser Ala Lys
515 520 525

Lys Arg Val Phe Val Thr Asn Ala Leu Arg Ala Leu Lys Tyr Val Ser
530 535 540

Pro Thr Gly Asn Ile Arg Asp Ile Pro Phe Val Val Ile Val Gly Gly
545 550 555 560

Ser Ala Leu Asp Phe Glu Ile Pro Gln Leu Val Thr Asp Glu Leu Ala
565 570 575

His Phe Asn Leu Val Ala Gly Arg Gly Asn Val Arg Gly Val Glu Gly
580 585 590

Pro Arg Asn Ala Val Ala Thr Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Gly Glu Glu
595 600 605

Arg Arg Lys Arg Tyr Glu Gln Arg
610 615

<210> 20

<211> 1851

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 20

atggcaactg	aaaaagtaat	tgggtgttgat	attgggaatt	cttccactga	agttgcattg	60
gcagatgtaa	gcgatagtg	gcaagttcac	tttattaact	ctggatttgc	tcctactact	120
gggattaaag	gtactaagca	gaatctagtt	ggaattaggg	attcaattac	tcaagttctg	180
aataaatcta	atctgacaat	cgatgatatt	gattttaattc	gaatcaatga	agccacgcca	240
gtaattgggtg	atgttgcaat	ggaaactatt	acagaaacag	ttgtaacaga	atcaacaatg	300
attgggcata	atcctaatac	accagggtgg	ataggaacag	gggctgggat	aacagttcgt	360
ttgcttgatc	tcttaaagaa	aactgataaa	agcaaaaatt	atatgttgtt	agttcctaag	420
gatattgatt	ttgaagacgt	tgctaaactt	atcaatgctt	atgttgcctc	tggttataaa	480
ataacagcag	caattctaag	aaacgatgat	ggtgttttag	ttgataatcg	gttaaatacat	540
aaaattccga	ttgtcgatga	agttgctatg	attgacaaag	ttccgttaaa	tatgctggca	600
gctgtagaag	ttgctggccc	tggacaagta	atttcacaac	tttcaaacc	gatatggatc	660
gctaccttat	ttggactaac	tccagaagag	actaagaata	ttgttccagt	ttctcgagcg	720
cttattggaa	atcgttcggc	tgttgttatt	aagactccag	ctggggatgt	taaagcgcga	780
gtaattccag	caggtaaaat	cataattaat	ggtgatactg	gaaaagaaga	agttggagtt	840
tctgaagggtg	ctgacgccat	tatgaaaaag	gtttctagtt	tccgccatat	taacaatata	900
actggtgagt	ctggaacc	tggttgagga	atgttggaaa	atgttcgtca	aacaatggca	960
gatcttacag	gaaagaaaaa	tgatgaaatt	gctattcaag	atttacttgc	tgttgatact	1020
caagtaccag	ttgaagttcg	aggcggctca	gctgggtgaat	tctcaaatga	atcagcagtt	1080
gggatcgcag	caatgggttaa	gtcagatcat	cttcaaatgg	aagtatttgc	taaacttatt	1140
gaaaaagaat	ttaatacaaa	ggttgaaatt	ggtgggtgctg	aagttgaatc	tgcaattcgt	1200
ggagcattaa	caactccagg	aacagataag	ccaatcgcaa	tccttgattt	aggtgctggc	1260
tcaacagatg	cttcaatcat	taataaagaa	aataatacag	ttgcaattca	cttagctggg	1320
gctggtgata	tggtaacgat	gattattaat	tctgaattag	gattgaatga	tattcatctt	1380
gcagaagaca	tcaaacgcta	cccattagca	aaggtagaaa	acctttttca	aattcgacat	1440
gaggatgggtt	cggttcaatt	ctttaaagat	ccgccttccat	catcactggt	tgccaaagtt	1500

```

gtagtaatta aaccagatgg atacgaacca gtaactggga atccaagcat tgaaaaaatt 1560
aaattagtgc gtcaaagtgc aaagaaacga gtatttgtaa cgaacgcttt acgggcactt 1620
aagtatgtta gtccaactgg aaatatcgt gatattccgt ttgttgtaat tgtcggtggt 1680
tcagccttag actttgaaat tccacaactt gttacagatg aattagcaca ctttaattta 1740
gttgctggtc gaggaaatgt tcgtggagtt gaaggaccac gaaatgccgt tgcaactgga 1800
ttgattttaa ggtatggcga agaaaagaagg aagcgttatg aacaacgatg a 1851

```

```

<210> 21
<211> 615
<212> PRT
<213> Lactobacillus reuteri

```

```

<400> 21

```

```

Met Ala Thr Glu Lys Val Ile Gly Val Asp Ile Gly Asn Ser Ser Thr
1          5          10          15

```

```

Glu Val Ala Leu Ala Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Ile Asn Phe Ile
          20          25          30

```

```

Gly Ser Gly Ile Ala Pro Thr Thr Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gln Asn
          35          40          45

```

```

Leu Val Gly Ile Arg Asp Ser Ile Asn Gln Val Leu Asn Lys Ala Asn
          50          55          60

```

```

Leu Thr Ile Asn Asp Ile Asp Leu Ile Arg Ile Asn Glu Ala Thr Pro
65          70          75          80

```

```

Val Ile Gly Asp Val Ala Met Glu Thr Ile Thr Glu Thr Val Val Thr
          85          90          95

```

```

Glu Ser Thr Met Ile Gly His Asn Pro Asp Thr Pro Gly Gly Ile Gly
          100          105          110

```

```

Thr Gly Ala Gly Ile Thr Val Arg Leu Leu Asp Leu Val Lys Lys Thr
          115          120          125

```

Asp	Lys	Ser	Gln	Asn	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Pro	Lys	Asp	Ile	Asp	Phe
	130					135					140				
Glu	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Ile	Asn	Ala	Tyr	Val	Ala	Ser	Gly	Tyr	Lys
145					150					155					160
Ile	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Lys	Asn	Asp	Asp	Gly	Val	Leu	Val	Asp	Asn
				165					170					175	
Arg	Leu	Asn	Lys	Pro	Ile	Pro	Ile	Val	Asp	Glu	Val	Ala	Met	Ile	Asp
			180					185					190		
Lys	Val	Pro	Leu	Asn	Met	Leu	Ala	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Gln	Val	Ile	Ser	Gln	Leu	Ser	Asn	Pro	Tyr	Gly	Ile	Ala	Thr	Leu	Phe
	210					215					220				
Gly	Leu	Asn	Pro	Glu	Glu	Thr	Lys	Asn	Ile	Val	Pro	Val	Ser	Arg	Ala
225					230					235					240
Leu	Ile	Gly	Asn	Arg	Ser	Ala	Val	Val	Ile	Lys	Thr	Pro	Ala	Gly	Asp
				245					250					255	
Val	Lys	Ala	Arg	Val	Ile	Pro	Ala	Gly	Asn	Ile	Ile	Ile	Asn	Ser	Asp
			260					265					270		
Thr	Gly	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Asp	Ala	Ile	Met
		275					280					285			
Lys	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Arg	His	Ile	Asn	Asp	Ile	Thr	Gly	Glu	Ser
	290					295					300				
Gly	Thr	Asn	Val	Gly	Gly	Met	Leu	Glu	Asn	Val	Arg	Gln	Thr	Met	Ala
305					310					315					320

Asp Leu Thr Gly Lys Lys Asn Ser Glu Ile Ala Ile Gln Asp Leu Leu
325 330 335

Ala Val Asp Thr Gln Val Pro Val Glu Val Arg Gly Gly Leu Ala Gly
340 345 350

Glu Phe Ser Asn Glu Ser Ala Val Gly Ile Ala Ala Met Val Lys Ser
355 360 365

Asp His Leu Gln Met Glu Val Ile Ala Lys Leu Ile Glu Asp Glu Phe
370 375 380

His Thr Lys Val Glu Ile Gly Gly Ala Glu Val Glu Ser Ala Ile Arg
385 390 395 400

Gly Ala Leu Thr Thr Pro Gly Thr Asp Lys Pro Ile Ala Ile Leu Asp
405 410 415

Leu Gly Ala Gly Ser Thr Asp Ala Ser Ile Ile Asn Lys Glu Asn Gln
420 425 430

Thr Val Ala Ile His Leu Ala Gly Ala Gly Asp Met Val Thr Met Ile
435 440 445

Ile Asn Ser Glu Leu Gly Leu Asn Asp Ile His Leu Ala Glu Asp Ile
450 455 460

Lys Arg Tyr Pro Leu Ala Lys Val Glu Asn Leu Phe Gln Ile Arg His
465 470 475 480

Glu Asp Gly Ser Val Gln Phe Phe Glu Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu
485 490 495

Phe Ala Arg Val Val Val Ile Lys Pro Asp Gly Tyr Glu Pro Val Thr
500 505 510

Gly Asn Pro Ser Ile Glu Lys Ile Lys Leu Val Arg Gln Ser Ala Lys
515 520 525

Lys Arg Val Phe Val Thr Asn Ala Leu Arg Ala Leu Lys Tyr Val Ser
530 535 540

Pro Thr Gly Asn Ile Arg Asp Ile Pro Phe Val Val Ile Val Gly Gly
545 550 555 560

Ser Ala Leu Asp Phe Glu Ile Pro Gln Leu Val Thr Asp Glu Leu Ala
565 570 575

His Phe Asn Leu Val Ala Gly Arg Gly Asn Val Arg Gly Val Glu Gly
580 585 590

Pro Arg Asn Ala Val Ala Thr Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Gly Glu Glu
595 600 605

Arg Arg Lys Gln Tyr Glu Gln
610 615

<210> 22
<211> 1848
<212> DNA
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 22
atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttgat atttggttaatt cttccactga agtagcgtta 60
gctgatgttg ctgataatgg aacaattaac ttatttggct ctggaatagc ccctactact 120
ggtatcaagg gtacaaaaca aaatctgggtt ggaattagag attccatcaa tcaagtcctt 180
aataaggcta atttaacgat taatgatatt gatttaattc ggattaatga ggcaacgcca 240
gttatcgggtg acgtagcgat ggaaacaatt accgaaacgg tcgtaaccga atcgactatg 300
atcggacata atcctgatac tcccgggtggt atttggaactg gtgcaggaat aacagttaga 360
ctattggatc ttgtcaaaaa gacggataaa agtcaaaaact atattgttgt tgttcccaag 420
gatattgatt ttgaagatgt tgctaaactg attaacgcct atgttgcttc gggctataag 480
attacagctg cgatcctaaa aaatgatgat ggtgtgttag ttgataatcg attgaataaa 540

c caattccga ttgttgatga agttgccatg attgataaag tcccattaaa tatgctggcg	600
gcagttgaag ttgctggttc gggacaagtt atctcgcac tttcaaattcc atatggaatt	660
gctaccttgt ttggattgaa tccagaagaa accaagaata ttgttcctgt ctcacgtgca	720
cttattggta accgttctgc cgttgtcatt aagacaccag caggggatgt taaggcacgg	780
gtaattccag ccggaaacat tatcattaac agcgataccg gaaaagaaga agttggtggt	840
tcagaagggtg ctgacgccat tatgaagaaa gtttccagtt tccgtcacat taatgatatt	900
actggagaat cagggactaa cgttggtgga atgcttgaaa atgttcgcca aacaatggct	960
gatttaactg gaaagaagaa tagtgaaatt gctattcaag atctattagc ggtagataca	1020
caggtgcctg tcgaagttcg cgggggcttg gctggtgaat tttcaaata ga atcagcagtt	1080
ggtattgctg cgatgggttaa gtctgatcat cttcaaattgg aagtaattgc taaattaatt	1140
gaggatgaat tccatacga ggttgagatt ggtggtgccg aagttgaatc tgcaattcgc	1200
ggtgcattaa cgacaccggg aacagataaa ccaattgcaa ttcttgattt aggtgccggc	1260
tcaacagatg cttcaattat caataaagaa aatcaaaactg tagcaattca cttagctggt	1320
gctggtgaca tggttacgat gattattaac tctgaattgg gattaaatga cattcacttg	1380
gcagaggata ttaagcgcta tccattagct aaagtcgaaa atctattcca aattcgtcat	1440
gaagatggat cgggtacaatt ctttgaagat ccgcttcgt catcattatt tgctcgtggt	1500
gttgtaatca aaccagatgg gtatgaaccg gttacgggta atccaagcat tgagaagatc	1560
aagctggttc gtcaaagtgc taagaagcgg gtattttgtaa ccaatgcatt acgagctctt	1620
aagtacgtca gcccgacagg aaacattcgt gatattccgt ttgttgtaat tgtcgggtgga	1680
tctgctcttg actttgaaat accacaactg gtaacagatg agttagcaca ctttaactta	1740
gttgccggac gtgggaatgt tcgtggagta gaaggccac gaaacgcggg tgcaacagga	1800
ttaattctcc gttatggcga agaaagaaga aagcaatatg aacaatga	1848

<210> 23

<211> 119

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 23

Met Asn Asn Asp Asp Ser Gln Arg Pro Ser Ile Val Val Gly Leu Glu
1 5 10 15

Asn Gly Ile Thr Ile Pro Asp Ser Val Lys Pro Leu Phe Tyr Gly Ile
20 25 30

Glu Glu Glu Gln Ile Pro Val Ser Val Arg Lys Ile Asn Ile Asn Asp
35 40 45

Thr Val Glu Arg Ala Tyr Gln Ser Ala Leu Ala Ser Arg Leu Ser Val
50 55 60

Gly Ile Ala Phe Glu Gly Asp His Phe Ile Val His Tyr Lys Asn Leu
65 70 75 80

Lys Glu Asn Gln Pro Leu Phe Asp Met Thr Ile Asn Asp Lys Lys Gln
85 90 95

Leu Arg Ile Leu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Leu Val Lys Gly Ile Pro
100 105 110

Phe Lys Glu Met Ala Asn Arg
115

<210> 24

<211> 360

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 24

atgaacaacg atgattcaca acgtccctcg attgtcgtcg gactagaaaa tggaataacg 60
attccagata gtgtcaagcc acttttttat ggaattgaag aagaacagat cccagtctca 120
gttcgtaaaa tcaatataaa tgatactgtt gaaagagcat accaatcagc tcttgcacat 180
aggctatctg taggaattgc ttttgaagga gatcatttta ttgttcacta taagaactta 240
aaagaaaatc agccttttatt tgatatgaca atcaatgata aaaagcaatt acgaatttta 300

ggagcaaatg cagcgagatt agtaaaagga atccctttta aggaaatggc aaacaggtga 360

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 25

Met Asn Asn Asp Ser Glu Arg Pro Ser Ile Ile Val Gly Val Glu Asn
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ile Pro Gln Asn Ala Ala Pro Leu Phe Asn Gly Ile Glu
20 25 30

Glu Glu Gln Ile Pro Val Ala Val Arg Glu Ile Asp Ile Asp Asn Val
35 40 45

Leu Ser Arg Ala Tyr Gln Ser Ala Leu Ala Ser Arg Leu Ser Val Gly
50 55 60

Ile Ala Phe Asp Gly Asp Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Asn Leu Lys
65 70 75 80

Glu Asn Lys Pro Leu Phe Asp Lys Thr Ile Ser Asp Gly Lys Gln Leu
85 90 95

Arg Val Leu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Leu Val Lys Gly Ile Pro Phe
100 105 110

Lys Glu Met Val Asn Arg
115

<210> 26

<211> 357

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 26

atgaacaatg attcagagcg tccctcaatt atcgtaggtg ttgagaatgg aacagctatt 60

cctcaaaatg cagcaccgct ttttaacgga attgaagaag aacaaatacc ggtggcggtt	120
agagaaatcg acattgataa tgttttaagt cgggcatacc agtcggccct cgcctcacga	180
ttatcagtag ggattgcttt tgatgggtgat cgatttatcg ttcactataa aaacttaaaa	240
gaaaacaaac cactatttga taaaacaatt agtgatggta agcaactacg agttctagga	300
gcaaatgcag cgcgactagt aaagggaatc ccccttaagg aaatggtaaa cagggtga	357

<210> 27
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 27	
atgaaacgtc aaaaacgatt tgaagaacta gaaaaac	37

<210> 28
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 28	
ttagttatcg ccccttagct tcttacgact tt	32

<210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> primer

<400> 29	
atgaaacgtc aaaaacgttt tgaagaacta	30

<210> 30
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 30

ctagttatca cccttgagct tcttt

25

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 31

atgggaggca taattccaat ggaaaaata

29

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 32

ttaacgaatt attgcttcgt aaaccatctt c

31

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 33

atgggaggca taatgccgat g

21

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 34

ttaacgaatt attgcttcgt aaatcatctt c

31

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 35

atgaatagac aatttgattt cttaatgcc a g

32

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 36

ttagtagatg ccatcgtaag cttttt

26

<210> 37

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 37

atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttgat att

33

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> primer

<400> 38
tcacctgttt gccatttcct taaaagggat t 31

<210> 39
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 39
atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttg 28

<210> 40
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> primer

<400> 40
tcacctgttt accatttcct taaagg 26

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、グリセロールから1, 3-プロパンジオールを製造する際の効率性を改善し、工業上有用なプロセスを提供することを目的とする。

【解決手段】 グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子、を含む形質転換体。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 4 6 2 8

20001206

住所変更

5 9 3 1 4 6 9 6 9

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

株式会社日本触媒